

9. Kennedy C.D., Gonsalves F. A. N. // J. Exp. Bot. 1987. Vol. 38. P. 800.
10. Serrano R. // The Plant Plasma Membrane. Berlin, 1990. P. 127.
11. Ros R., Morales A., Segura J., Picazo I. // Plant Sci. 1992. Vol. 83. P. 1.
12. Chaney R.L. // Zinc in soil and plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publ. 1993. P. 135.
13. Mishra D., Kar M. // Bot. Rev. 1974. Vol. 1. P. 395.
14. Упит и с В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микророслей. Рига, 1983.

Поступила в редакцию 10.12.2004.

Анатолий Иосифович Соколик - кандидат биологических наук, заведующий НИЛ физиологии растительной клетки.

Нина Шотаевна Мангаладзе - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии растений Кутаисского государственного университета им. А. Церетели.

Джаба Ардеванович Ониани - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гидробиологии и токсикологии Тбилисского государственного университета им. И. Джавахишвили.

Владимир Михайлович Юрин - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений.

Тамара Ираклиевна Ониани - научный сотрудник лаборатории экологической биофизики Тбилисского государственного университета им. И. Джавахишвили.

УДК 576.31

Ю.И. КОЖУРО

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ХРОМАТИНА ЯЧМЕНЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДА ТРЕФЛАНА

The investigation of the herbicide treflan action on root cells of *Hordeum vulgare* L. was performed. The treflan presence at seeds germination results to DNA degradation. The features revealed allow interpreting the phenomenon described as a programmed cell death induced in root cells.

Повышенный интерес к изучению механизмов действия используемых в сельскохозяйственной практике пестицидов связан с их негативным влиянием на физиологические и генетические процессы у растений. Известно, что гербицид трефлан (действующее вещество - 2,6-динитро-4-(трифторметил)-М,М-дипропиламин) блокирует деление клеток из-за деполимеризации сети микротрубочек [1, 2]. Вследствие высокой персистентности остатки этого гербицида могут повреждать последующие культуры севооборота - овес, ячмень и пшеницу [3]. В настоящей работе изучено действие трефлана на генетический аппарат клеток корневой меристемы проростков ячменя.

Материал и методика

Объектом исследования служили проростки многорядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Визит. Семена проращивали в водных растворах трефлана при 25 °С. В контрольных экспериментах использовали дистиллированную воду. Для цитогенетического анализа корешки фиксировали в смеси уксусной кислоты и этилового спирта (1:3) и окрашивали ацетоорсеином. Давленные временные препараты готовили по стандартной методике [4]. Учитывали долю клеток с абберациями хромосом в ана- и телофазных клетках. Анализ спектра аббераций проводили по известной методике [5] с выделением хроматидных (одиночных) и хромосомных (двойных) мостов и фрагментов, а также отставаний хромосом (геномные мутации). Цитотоксическую активность гербицида оценивали по его влиянию на процесс деления клеток в корневой меристеме проростков. Митотические и фазовые индексы определяли по общепринятым методикам [6]. Результаты статистически обрабатывали с использованием критерия Стьюдента.

ДНК из корней проростков выделяли обычным методом [7]. Электрофорез проводили в 1,5 % агарозном геле с 40 ммоль/л триацетатным буфером, содержащим 0,5 мкг/мл бромистого этидия [8]. После электрофоретического разделения ДНК гели сканировали с помощью системы ImageMaster VDS-CL («Amersham», США).

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные цитогенетического анализа действия трефлана в различных концентрациях на клетки корневой меристемы проростков ячменя. Возраст проростков составлял 46 ч от начала замачивания. Как видно

из результатов, гербицид в диапазоне анализируемых концентраций не вызывал статистически достоверного увеличения количества перестроек хромосом. При обработке проростков трефланом в концентрации 1,0 мг/л количество подобных нарушений было почти в 3 раза больше, чем в контроле, однако это в пределах ошибки выборки. Обработка ячменя трефланом не приводила также к изменению спектра хромосомных перестроек. Наблюдаемые в опыте хроматидные мосты, хроматидные фрагменты и не идентифицированные перестройки хромосом присутствовали и в контроле.

Таблица 1

Влияние трефлана на частоту и спектр aberrаций хромосом в корневой меристеме проростков ячменя

Концентрация препарата, мг/л	Просмотрено клеток	Количество клеток с хромосомными aberrациями, %	Количество перестроек хромосом на 100 клеток	Распределение перестроек по типам, %			
				Одиночный мост	Одиночный мост с фрагментом	Одиночный фрагмент	Прочее
Контроль	1057	0,47±0,21	0,28±0,16	33,4	—	33,3	33,3
0,01	1013	0,89±0,30	0,59±0,24	50,0	16,7	16,7	16,6
0,05	1011	0,49±0,22	0,20±0,14	50,0	—	—	50,0
0,50	1011	13,35±1,07***	0,30±0,17	33,3	—	66,7	—
1,00	1004	32,47±1,48***	0,80±0,28	50,0	—	50,0	—

Примечание. *** – разница достоверна при $P_{0,999}$.

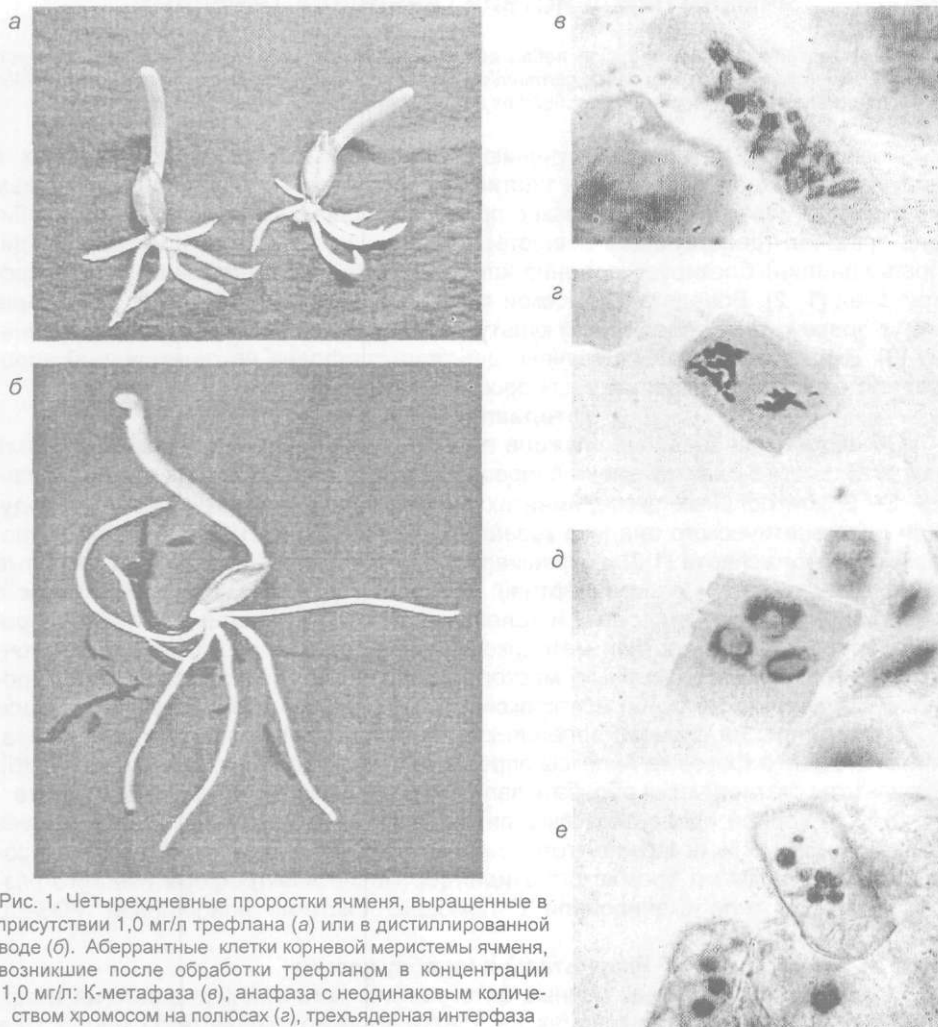


Рис. 1. Четырехдневные проростки ячменя, выращенные в присутствии 1,0 мг/л трефлана (а) или в дистиллированной воде (б). Абберантные клетки корневой меристемы ячменя, возникшие после обработки трефланом в концентрации 1,0 мг/л: К-метафаза (в), анафаза с неодинаковым количеством хромосом на полюсах (г), трехъядерная интерфаза (д), клетка с признаками гибели (е)

Вместе с тем цитотоксическое действие трефлана было ярко выраженным. При концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л гербицид с высокой частотой вызывал нарушения расхождения хромосом в ходе митоза. В результате регистрировались отставания хромосом, многополюсные анафазы, многоядерные клетки, клетки с микроядрами и прочие нарушения. Кроме того, трефлан оказывал на клетки колхицинподобное действие, о чем свидетельствует появление большого количества К-митозов (рис. 1).

При обработке проростков ячменя трефланом изменялся также митотический индекс (табл. 2). Так, при концентрациях трефлана 0,05 и 0,5 мг/л происходило увеличение митотического индекса в 1,4 и 1,5 раза соответственно ($P_{0.999}$). Анализ фазовых индексов показал, что увеличение количества делящихся клеток при концентрации 0,05 мг/л связано с ростом числа профазных клеток ($P_{0.99}$), а при концентрации 0,5 мг/л - клеток, находящихся на разных стадиях митоза. Обработка проростков ячменя трефланом в концентрации 1,0 мг/л приводила к статистически достоверному увеличению количества клеток, находящихся на стадии метафазы, ана- и телофазы.

Таблица 2

Влияние трефлана на процесс деления в корневой меристеме проростков ячменя

Концентрация препарата, мг/л	Просмотрено клеток	Митотический индекс, %	Число делящихся клеток, %		
			Профаза	Метафаза	Ана-, телофаза
Контроль	2000	7,65±0,59	2,30±0,34	2,05±0,32	3,30±0,40
0,01	2000	7,70±0,60	2,95±0,38	1,90±0,31	2,85±0,37
0,05	2000	10,95±0,70***	4,00±0,44"	2,85±0,37	4,10±0,44
0,50	2000	11,40±0,71***	3,45±0,41*	3,95±0,44***	4,00±0,44
1,00	2050	7,61±0,59	1,90±0,30	3,76±0,42**	2,00±0,31"

Примечание. * - разница достоверна при $P_{0.95}$, ** - разница достоверна при $P_{0.99}$, *** - разница достоверна при $P_{0.999}$

Таким образом, трефлан оказывает цитотоксическое действие на растения, вызывая задержку митоза на стадии метафазы, что, как указывалось ранее, связано с нарушением полимеризации тубулина. Известно, что нарушение стабильности белков цитоскелета приводит к гибели клеток [9, 10], однако, связан ли микротрубочковый цитоскелет напрямую с индукцией программируемой клеточной гибели (ПКГ), еще не установлено.

При обработке проростков ячменя трефланом в концентрации 1,0 мг/л с частотой $1,16 \pm 0,33$ % нами зарегистрировано появление интерфазных клеток с признаками гибели (см. рис. 1 е). В контроле была обнаружена только одна подобная клетка на 1000 проанализированных. Из этих наблюдений видно, что массовая гибель клеток не наступает непосредственно сразу после возникновения нарушений митоза, так как имеется несоответствие количества аномальных анателофаз, наблюдаемых в первом митозе (см. табл. 1) и интерфазных клеток с признаками гибели, обнаруживаемых после завершения деления.

Одним из критериев, свидетельствующих о гибели клеток, является присутствие продуктов деградации ДНК - либо низкомолекулярных, либо кратных по размеру нуклеосомной ДНК (≈ 180 н. п.). Нами была выделена ДНК из проростков ячменя различного возраста, подвергавшихся обработке трефланом в течение всего срока прорастания. Как видно из рис. 2, ДНК четырехдневных проростков имеет явные отличия по степени полимерности от ДНК проростков, не подвергавшихся обработке трефланом. Во фракции деградированной ДНК

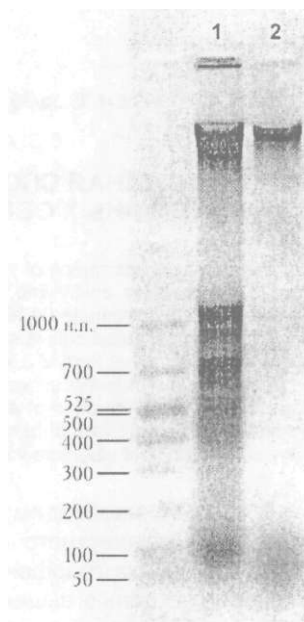


Рис. 2. Фрагментация ДНК ячменя после обработки растений трефланом. ДНК, выделенная из четырехдневных проростков, выращенных в присутствии 1,0 мг/л трефлана (1) или в дистиллированной воде (2)

отчетливо преобладают два типа фрагментов, имеющих размеры приблизительно 720 и 1080 н. п. Их величина кратна размеру нуклеосомной ДНК. Подобной деградации не обнаружено у двух- и трехдневных, обработанных трепланом проростков.

Полученные данные могут быть объяснены следующим образом. Клетки с нарушениями хромосомного аппарата выходят из митоза, формируя многоядерные интерфазы (см. рис. 1 б). В дальнейшем они не могут осуществить процесс дифференцировки. Это приводит к массовой ПКГ, что и наблюдается у четырехдневных проростков. Косвенным подтверждением может также служить и визуальное изучение проростков ячменя, которое показывает, что корешки, инкубировавшиеся в присутствии 1,0 мг/л треплана, имеют меньшую длину и большую толщину по сравнению с контрольными (см. рис. 1 а, б).

Суммируя результаты работы, следует отметить, что треплан вызывает широкий спектр повреждений клеток ячменя: нарушение расхождения хромосом и блок-митоза в метафазе, следствием чего является индукция массовой ПКГ.

1. Appleby A.P., Valverde B.E. //Weed Technol. 1989. Vol. 3. P. 198.
2. Vaughn K.C., Lehen L.P. //Weed Sci. 1991. Vol. 39. P. 450.
3. Лунев М.И., Кретова Л.Г. //Защита растений. 1991. Vol. 7. P. 22.
4. Дарлингтон С.Д., Ла Кур Л.Ф. Хромосомы. Методы работы. М., 1990.
5. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. //Генетика. 1972. Т. 8. С. 133.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М., 1974.
7. Ramachandra S., Studzinski G.P. Cell growth and apoptosis. A practical approach / Ed. by G.P. Studzinski. Oxford, 1995. P. 132.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. С. 157.
9. Kobayashi I., Kobayashi Y., Hardham A. //Planta. 1994. Vol. 195. P. 237.
10. Binet M.-N., Humbert C., Lecourieux D. et al. //Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 564.

Поступила в редакцию 29.09.2004.

Юрий Иосифович Кожуро - научный сотрудник кафедры генетики.

УДК 631.527: [633.2+633.36/39]

В.С. АНОХИНА, И.Б. САУК, Н.А. БОЛДЫРЕВА

АДАПТИВНАЯ СПОСОБНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОТИПОВ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ ЛЮПИНОВ ЖЕЛТОГО И УЗКОЛИСТНОГО

We carry out estimation of yellow and narrow-leaved lupin collections on general (GAA) and specific (SAA) adaptive ability and parameter of selection value of genotypes (SVG). It is not revealed samples, which combined a high index of selection value of genotypes (SVG) to a high index GAA among the investigated cultivars of narrow-leaved lupin. Among cultivars of yellow lupin there are cultivar Faust and mutant form M 3, which combined high index GAA with stability and high index SVG.

The analysis of selection value (SVG) old and new created yellow lupin genotypes testifies that this parameter are increase of at last years selection cultivars. So at old selection cultivars this index be equal to 1, at cultivars of new selection - 1.5. However, old selection cultivars (Weisbauch, Wista) have a high index of selection value (SVG), and may be include in a system of crossing.

В связи с необходимостью расширения ареала культивирования люпинов желтого и узколистного и изменчивостью климатических условий актуальной является оценка генофонда этой культуры по адаптивной способности и стабильности с целью выделения высокопластичных и стабильных генотипов, обладающих семенной и вегетативной продуктивностью. Эта задача важна и для поиска генотипов, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам.

Нами изучена адаптивная способность и стабильность 39 сортов и образцов люпина желтого и 12 сортов люпина узколистного по составляющим компонентам семенной продуктивности в зависимости от года репродукции. Адаптивную способность, относительную стабильность и селекционную ценность генотипов определяли по методике [1], согласно которой под адаптивной способностью понимается способность генотипа поддерживать свойственное ему фенотипическое выражение признака в определенных условиях среды. Общая адаптивная способность генотипа (ОАС) характеризует среднее значение признака в